



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 35 902 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
C 07 K 17/00
C 07 K 7/00
C 07 K 14/00

⑲ Aktenzeichen: 197 35 902.7
⑳ Anmeldetag: 19. 8. 97
㉓ Offenlegungstag: 25. 2. 99

DE 197 35 902 A 1

⑦① Anmelder:
Imtec Immundiagnostika GmbH, 16341 Zepernick,
DE

⑦② Erfinder:
Schößler, Werner, Dr.rer.nat. habil., 16341
Schwanebeck, DE; Hiepe, Falk, Prof. Dr., 12557
Berlin, DE; Hentschel, Christian, Dr., 16356 Birkholz,
DE; Pfüller, Barbara, Dr., 16341 Zepernick, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ **Selektives Adsorbens für biologische Materialien**
⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen, Viren und anderen Erregern, Endotoxinen, C-reaktivem Protein, Amyloid, DNA, Cardiolipin, Fibronectin, Fibrinogen und anderen biologischen Verbindungen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie. Das erfindungsgemäße selektive Adsorbens enthält an feste Träger gebundene synthetische Peptide, die eines der aktiven Zentren des Proteins Clq simulieren. Besonders bevorzugte Verbindungen sind die Peptide
NH₂-RFDHVITNMNNNYEPR-COOH und
NH₂-QWEICLSIVSSSRGQVRRSLGF-COOH.

DE 197 35 902 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen, Viren und anderen Erregern, Endotoxinen, C-reaktivem Protein, Amyloid, DNA, Cardiolipin, Fibrinogen und anderen biologischen Verbindungen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Die Bildung zirkulierender Immunkomplexe (Antigen/Antikörper-Komplexe) stellt einen physiologischen Abwehrmechanismus zur Eliminierung endogener oder exogener Antigene dar. Hierzu werden die zirkulierenden Immunkomplexe an die Subkomponente C1_q der ersten Komponente gebunden und führen im folgenden zur Aktivierung des Komplementsystems und zur Auslösung der Komplementkaskade, wobei durch Freisetzung einer Vielzahl von biologisch aktiven Substanzen der Entzündungsprozeß initiiert wird.

Unter Nutzung dieser biospezifischen Wechselwirkung gelang es, zirkulierende Immunkomplexe aus Körperflüssigkeiten mit einem an einen Träger gebundenen Protein C1_q selektiv und spezifisch zu binden. Damit können insbesondere Autoimmunerkrankungen, bei denen Immunkomplexe eine pathogenetische Rolle spielen, wirkungsvoll therapiert werden (DD 241 791).

Es ist ferner bekannt, daß Glykoproteine des HI-Virus, wie gp 41 oder gp 120, mit dem Protein C1_q in Wechselwirkung treten können (Stoiber et. al., Molecular Immunology, Vol. 32 (1995), S. 371-374).

Ein Nachteil des an sich recht effektiven Verfahrens zur Entfernung verschiedener pathogener Stoffe aus Körperflüssigkeiten mit Hilfe von trägergebundenem C1_q besteht in der aufwendigen und teuren Isolierung von C1_q aus humanem oder tierischem Plasma/Serum sowie in der begrenzten Verfügbarkeit des Ausgangsmaterials. Hinzu kommt, daß das Protein C1_q – wie viele Proteine – recht instabil ist und somit während seiner Isolierung und Reinigung an Aktivität verlieren kann. Des weiteren ist eine standardisierte Herstellung von C1_q außerordentlich schwierig und in der Praxis häufig nicht gegeben. Schließlich birgt das Verfahren der Präparation aus humanen oder tierischen Seren die Gefahr der Übertragung von Infektionen in sich.

Ziel der Erfindung ist daher, ein selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen, Retroviren und analogen pathogenen Substanzen in Körperflüssigkeiten zu entwickeln, wobei das bindende Mittel im Adsorbens reproduzierbar herstellbar und damit leicht zugänglich sein soll.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß synthetische Peptide, die jeweils eines der aktiven Zentren des C1_q simulieren, zur Realisierung dieser Zielstellung geeignet sind. Auf der Grundlage dieses Befundes wird die Aufgabe der Erfindung mittels eines Adsorbens gemäß den Ansprüchen 1 bis 16 realisiert. Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung dieses Adsorbens gemäß Anspruch 17 und 18.

Es handelt sich bevorzugt um die folgenden Peptide:

Peptid 1: NH₂-LEQGENVFLQATLLC-COOH

Peptid 2: NH₂-LEQGENVFLQAT-COOH

Peptid 3: NH₂-RFDHVITNMNNNYEPR-COOH

Peptid 4: NH₂-QWEICLSIVSSSRGQVRRSLGF-COOH

Peptid 5: NH₂-HTANLCVLLYRSGVKVVTFCOOH

Peptid 6: NH₂-AGRPGRRRPGLK-COOH

Peptid 7: NH₂-GIKGTGKSPGNKQPR-COOH

Peptid 8: NH₂-GAPGKGESGDYKATQK-COOH

Peptid 9: NH₂-GIPGEPGEEGRYKQKFQ-COOH.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß sich Immunkomplexe, Viren und andere Erreger, Endotoxine, C-reaktives Protein, Amyloid, DNA, Cardiolipin, Fibrinogen und andere biologische Verbindungen in einer hohen

Affinität und Selektivität an die immobilisierten Peptide binden.

Die Immobilisierung erfolgt an ein selektives Adsorbens, wobei die eingesetzten festen Träger bevorzugt aus sphärischen, flächenförmigen oder faserförmigen Formkörpern bestehen oder als dünne Schichten, Filme oder Lacke auf anderen Trägern aufgebracht sind. Die Formkörper sind durch Packung, Verweben, Sinterung oder durch Bindemittel zu vorzugsweise flächenförmigen Trägermaterialien oder Kolonnenpackungen zusammengestellt.

Als Trägermaterial werden verschiedene Stoffe eingesetzt

- organische Polymere, vorzugsweise sphärische Polyhydroxyethylmethacrylate, insbesondere Amino-Polyhydroxymethacrylate, deren Partikelgröße 10–1000 µm beträgt und deren Porosität > 10 nm ist
- natürliche Polymere, vorzugsweise Zelluloseträger, deren Partikelgröße 10–1000 µm beträgt und deren Porosität > 10 nm ist oder
- anorganische Polymere, vorzugsweise siliziumdioxidhaltige Materialien.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung werden homo- oder heterobifunktionelle Reagenzien und andere Verbindungen wie Epichlorhydrin, CNBr, Carbodiimide oder Glutardialdehyd mit und ohne Spacer als Brückenverbindungen zwischen Träger und Peptid eingesetzt.

Die Verwendung dem erfindungsgemäßen selektiven Adsorbens erfolgt in der Weise, daß das Adsorbens mit der Körperflüssigkeit, insbesondere Blut, Plasma oder Serum, in Kontakt gebracht wird und nach Bindung der Immunkomplexe, Retroviren, Endotoxine oder des C-reaktiven Proteins an das synthetische Peptid die feste Phase abgetrennt wird. Anschließend erfolgt eine Regenerierung der festen Phase durch Behandlung mit nicht denaturierenden Medien und Wiederverwendung derselben. Als nicht denaturierende Medien werden bevorzugt gepufferte Lösungen hoher Ionenstärke, chaotropische Reagenzien oder stark saure bzw. alkalische Lösungen eingesetzt.

Die Wirksamkeit der erfindungsgemäß eingesetzten Peptide wird anhand eines Vergleichs der Dissoziationskonstanten dieser Peptide mit dem Protein C1_q belegt. Tabelle 1 zeigt die Hemmbarkeit der Bindung zwischen der mit C1_q bzw. Peptid 4 beladenen festen Phase (Mikrotitrationsplatte) und aggregierten humanen Immunglobulin (Stimulierung zirkulierender Immunkomplexe) durch die Peptide P1 bis P5 im Enzymimmunoassay. Je kleiner dabei die Dissoziationskonstante *k_d* ist, desto besser ist die Hemmung.

Besonders bevorzugt ist der Einsatz von Peptid 3 und Peptid 4.

Patentansprüche

1. Selektives Adsorbens zur Bindung von Immunkomplexen, Viren und anderen Erregern, Endotoxinen, C-reaktivem Protein, Amyloid, DNA, Cardiolipin, Fibrinogen und anderen biologischen Verbindungen, enthaltend an feste Träger gebundene synthetische Peptide, die eines der aktiven Zentren des Proteins C1_q simulieren.
2. Selektives Adsorbens nach Anspruch 1, enthaltend das Peptid NH₂-LEQGENVFLQATLLC-COOH
3. Selektives Adsorbens nach Anspruch 1, enthaltend das Peptid NH₂-LEQGENVFLQAT-COOH
4. Selektives Adsorbens nach Anspruch 1, enthaltend das Peptid NH₂-RFDHVITNMNNNYEPR-COOH
5. Selektives Adsorbens nach Anspruch 1, enthaltend das Peptid NH₂-QWEICLSIVSSSRGQVRRSLGF-

COOH

6. Selektives Adsorbens nach Anspruch 1, enthaltend
das Peptid $\text{NH}_2\text{-HTANLCVLLYRSGVKVVTFCOOH}$
7. Selektives Adsorbens nach Anspruch 1, enthaltend 5
das Peptid $\text{NH}_2\text{-AGRPGRGRPGLK-COOH}$
8. Selektives Adsorbens nach Anspruch 1, enthaltend
das Peptid $\text{NH}_2\text{-GIKGTKGSPGNKDQPR-COOH}$
9. Selektives Adsorbens nach Anspruch 1, enthaltend
das Peptid $\text{NH}_2\text{-GAPGPKGESGDYKATQK-COOH}$ 10
10. Selektives Adsorbens nach Anspruch 1, enthaltend
das Peptid $\text{NH}_2\text{-GIPGEPGEEGRYKQKFQ-COOH}$
11. Selektives Adsorbens nach Anspruch 1 bis 10, da-
durch gekennzeichnet, daß die eingesetzten festen Trä-
ger aus sphärischen, flächenförmigen oder faserförmigen 15
Formkörpern bestehen oder als dünne Schichten,
Filme oder Lacke auf anderen Trägern aufgebracht
sind.
12. Selektives Adsorbens nach Anspruch 1 bis 11, da-
durch gekennzeichnet, daß die Formkörper durch Pak- 20
kung, Verweben, Sinterung oder durch Bindemittel zu
vorzugsweise flächenförmigen Trägermaterialien oder
Kolonnenpackungen zusammengestellt sind.
13. Selektives Adsorbens nach Anspruch 1 bis 12, da-
durch gekennzeichnet, daß als Träger organische Poly- 25
mere, vorzugsweise sphärische Polyhydroxyethylme-
thacrylate, insbesondere Amino-Polyhydroxymetha-
crylate, zum Einsatz gelangen, deren Partikelgröße
10–1000 µm beträgt und deren Porosität > 10 nm ist.
14. Selektives Adsorbens nach Anspruch 1 bis 12, da- 30
durch gekennzeichnet, daß als Träger natürliche Poly-
mere zum Einsatz gelangen, vorzugsweise Zellulose-
träger, deren Partikelgröße 10–1000 µm beträgt und
deren Porosität > 10 nm ist.
15. Selektives Adsorbens nach Anspruch 1 bis 12, da- 35
durch gekennzeichnet, daß als Träger anorganische Po-
lymere zum Einsatz gelangen, vorzugsweise silizium-
dioxidhaltige Materialien.
16. Selektives Adsorbens nach Anspruch 1 bis 15, da-
durch gekennzeichnet, daß homo- oder heterobifunk- 40
tionelle Reagenzien und andere Verbindungen wie Epi-
chlorhydrin, CNBr, Carbodiimide oder Glutardialde-
hyd mit und ohne Spacer als Brückenverbindungen
zwischen Träger und Peptid eingesetzt werden.
17. Verwendung des selektiven Adsorbens nach An- 45
spruch 1–16, dadurch gekennzeichnet, daß das Adsor-
bens mit der Körperflüssigkeit, insbesondere Blut,
Plasma oder Serum, in Kontakt gebracht wird und nach
Bindung der Immunkomplexe, Retroviren, Endotoxine
oder des C-reaktiven Proteins an das synthetische Pep- 50
tid die feste Phase abgetrennt wird und anschließend
eine Regenerierung der festen Phase durch Behandlung
mit nicht denaturierenden Medien und Wiederverwen-
dung derselben erfolgt.
18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekenn- 55
zeichnet, daß die nicht denaturierenden Medien gepuf-
ferte Lösungen hoher Ionenstärke, chaotropische Rea-
genzien oder stark saure bzw. alkalische Lösungen
sind.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

60

65

Hemmung Peptid / Clq

Feste Phase	Hemmer	K _d ($\mu\text{g/ml}$)	K _d ($\mu\text{mol/l}$)
Clq	P1	32	21
Clq	P2	>>50	>>41
Clq	P3	7	4
Clq	P4	10	4
Clq	P5	35	18
Clq	Clq	17	0,04
P4	P1	15	10
P4	P2	15	13
P4	P4	4	2
P4	P5	5	3
P4	Clq	5	0,01

aggregiertes IgG: 0,8 $\mu\text{g/ml}$ final

Tab. 1